



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΧΗΜΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

Ογκολογία....

απο την Ογκογένεση έως τη Θεραπεία



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΥΠΟΔΟΧΕΑ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ β (ER β) ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ
ΜΑΣΤΟΥ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ: Δρ ΔΗΜΗΤΡΑ ΜΗΤΣΙΟΥ, ΚΥΡΙΑ ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ

ΙΩΑΝΝΑ ΜΑΝΟΥΡΑ-ΖΩΝΟΥ

1140051

ΑΘΗΝΑ 2023



UNIVERSITY OF CRETE
SCHOOL OF HEALTH SCIENCES
DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY



NATIONAL HELLENIC RESEARCH FOUNDATION
INSTITUTE OF CHEMICAL BIOLOGY

INTERINSTITUTIONAL PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDIES
IN
ONCOLOGY



MASTER THESIS

EXPRESSION OF ESTROGEN RECEPTOR BETA (ER β) IN BREAST CANCER

SUPERVISOR: SENIOR RESEARCHER DIMITRA MITSIOU, PhD

IOANNA MANOURA-ZONOU

1140051

ATHENS 2023

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης που απονέμει το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, σε συνεργασία με το Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών.

Εγκρίθηκε από τη κάτωθι τριμελή εξεταστική επιτροπή:

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δρ Μήτσιου Δήμητρα, Κύρια Ερευνήτρια (Επιβλέπουσα)

Δρ Γεωργιάδης Παναγιώτης, Κύριος Ερευνητής

Δρ Παπαδόδημα Όλγα, Ειδική Λειτουργική Επιστήμονας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Μήτσιου Δήμητρα για την επίβλεψη της μεταπτυχιακής μου εργασίας στην ομάδα Μοριακής Ενδοκρινολογίας (ΙΧΒ/ΕΙΕ) και την καθοδήγησή της τον τελευταίο χρόνο, τόσο στην εκπόνηση, όσο και στην συγγραφή αυτής της εργασίας.

Τον κύριο Αλέξη Μιχαήλ για τη συμβολή του στην ανάλυση των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή αυτής της εργασίας.

Τον κύριο Γεωργιάδη Παναγιώτη και την κυρία Παπαδόδημα Όλγα, για την συμμετοχή τους στην τριμελή επιτροπή αξιολόγησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Την κυρία Γάνου Βασιλική για την βοήθεια που μου προσέφερε καθόλη τη διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο.

Την κυρία Στασινοπούλου Σωτηρία για την συνεργασία της.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την υποστήριξη όλα τα χρόνια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη-Σκοπός	5
1. Εισαγωγή	7
1.1 Καρκίνος του Μαστού	7
1.1.1 Στατιστικά	7
1.1.2. Παράγοντες κινδύνου	8
1.1.3 Σταδιοποίηση - Σύστημα TNM	8
1.1.4 Μοριακοί τύποι καρκίνου του μαστού	9
1.1.5 Βαθμός διαφοροποίησης	10
1.2 Υποδοχείς Οιστρογόνων	11
1.2.1 Γενικά	11
1.2.2 Δομή και μηχανισμός δράσης υποδοχέων οιστρογόνων	12
1.3 Θεραπεία καρκίνου του μαστού	13
1.4 ERβ και καρκίνος του μαστού	15
2. Κύριο Μέρος	17
2.1 Υλικά και Μέθοδοι	17
2.1.1 Υλικά	17
2.1.1.1 Γενικά υλικά	17
2.1.1.2 Αντισώματα	17
2.1.1.3 Δείγματα ασθενών	18
2.1.2 Μέθοδοι	18
2.1.2.1 Ανοσοϊστοχημεία	18
2.1.2.1.1 Ανοσοϊστοχημική χρώση τομών όγκου από μπλοκ παραφίνης	18
2.1.2.1.2 Αξιολόγηση ανοσοϊστοχημικής χρώσης	19
2.1.2.2 Στατιστική ανάλυση	20
2.2 Αποτελέσματα και Συζήτηση	21
2.2.1 Ανοσοϊστοχημική χρώση των ERβ1 και ERβ2	21
2.2.2. Συσχέτιση των ERβ1 και ERβ2 με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους	23
3. Συμπεράσματα	28
4. Βιβλιογραφία	29

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα οιστρογόνα ρυθμίζουν τη φυσιολογία ιστών και οργάνων μέσω δύο ισοτύπων του υποδοχέα οιστρογόνων, των ERα και ERβ. Οι υποδοχείς οιστρογόνων διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη, στη διηθητικότητα και στη μετάσταση του καρκίνου του μαστού. Είναι γνωστό ότι ο ERα προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του πρώιμου ERα+/PR+/HER2- (εφεξής ERα+) καρκίνου του μαστού και ότι η συμπληρωματική ενδοκρινική θεραπεία (ΣΕΘ) με αντιοιστρογόνα ή αναστολείς αρωματάσης είναι η θεραπεία επιλογής για ασθενείς με πρώιμο ERα+ καρκίνο του μαστού. Ωστόσο, πολλοί ασθενείς που υποβλήθηκαν σε ΣΕΘ τελικά υπέστησαν υποτροπή πριν από την ολοκλήρωση της προβλεπόμενης πενταετούς θεραπείας. Επομένως, υπάρχει ανάγκη ταυτοποίησης επιπλέον προγνωστικών δεικτών που θα μπορούν να αναγνωρίσουν εκείνους τους ασθενείς με ERα+ καρκίνο του μαστού που έχουν υψηλό κίνδυνο πρόωρης υποτροπής. Από τις πέντε ισομορφές του ERβ μόνο ο ERβ1 έχει ικανότητα δέσμευσης οιστρογόνων και αντιοιστρογόνων. Οι ERβ1 και ERβ2 εκφράζονται συχνότερα στον καρκίνο του μαστού, ωστόσο η κλινική σημασία τους στο πρώιμο ERα+ καρκίνο του μαστού παραμένει ασαφής. Για το λόγο αυτό έγινε προσπάθεια συσχέτισης της έκφρασης των ERβ1 και ERβ2 με άλλα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά σε δείγματα από 27 ασθενείς με πρώιμο ERα+ καρκίνο του μαστού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των δυο ισομορφών ($p=0,0124$), αλλά όχι κάποια συσχέτιση με τα υπόλοιπα γνωστά κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων. Περαιτέρω μελέτη, με μεγαλύτερο αριθμό ασθενών καθώς και συσχέτιση με την εξέλιξη της νόσου είναι απαραίτητη προκειμένου να αναδειχθεί η πιθανή προγνωστική σημασία των ERβ1 και ERβ2 στον ERα-θετικό καρκίνο του μαστού.

ΛΕΞΕΙΣ-ΚΛΕΙΔΙΑ

Καρκίνος Μαστού, Υποδοχέας Οιστρογόνων α (ERα), Ισομορφές του Υποδοχέα Οιστρογόνων βήτα (ERβ), Υποδοχέας οιστρογόνων β1 (ERβ1), Υποδοχέας οιστρογόνων β2 (ERβ2), Κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά

ΣΚΟΠΟΣ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ταυτοποίηση της έκφρασης του ERβ1 και ERβ2, ισομορφών του ERβ, σε τομές ιστών από ERα-θετικούς όγκους καρκίνου του μαστού και η συσχέτισή της με διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των καρκινικών όγκων. Η μελέτη αυτή αποσκοπεί να συμβάλει στη διερεύνηση της προγνωστικής σημασίας των ERβ1 και ERβ2 στην εξέλιξη της νόσου και στην επιλογή κατάλληλης θεραπείας.

ABSTRACT

Estrogen regulates tissue and organ physiology through two isoforms of the estrogen receptor, ER α and ER β . Estrogen receptors play an important role in growth, invasiveness and metastasis of breast cancer. It is known that ER α promotes proliferation of early ER α +/PR+/HER2- (hereafter ER α +) breast cancer cells and that adjuvant endocrine therapy (AET) with antiestrogens or aromatase inhibitors is the treatment of choice for patients with early ER α + breast cancer. However, many patients who underwent AET eventually relapsed before completing the intended five-year course of treatment. Therefore, it is important to identify additional prognostic markers that will be able to recognize those patients with ER α + breast cancer who are at high risk of an early recurrence. Out of the five isoforms of ER β , only ER β 1 has the ability to bind estrogen and antiestrogen. ER β 1 and ER β 2 are more frequently expressed in breast cancer, yet their clinical significance in early ER α + breast cancer remains unclear. For this reason, an attempt was made to associate the expression of ER β 1 and ER β 2 with other clinico-pathological characteristics in samples from 27 patients with early ER α + breast cancer. The results showed a strong correlation between the expression of the two isoforms ($p=0.0124$), but no correlation with the rest of the known clinico-pathological characteristics of the tumors. A further study with a larger number of patients, as well as association with disease progression is necessary in order to highlight the potential prognostic significance of ER β 1 and ER β 2 in ER α -positive breast cancer.

KEYWORDS

Breast cancer, Estrogen receptor alpha (ER α), Estrogen receptor beta (ER β) isoforms, Estrogen receptor beta 1 (ER β 1), Estrogen receptor beta 2 (ER β 2), Clinico-pathological characteristics

PURPOSE

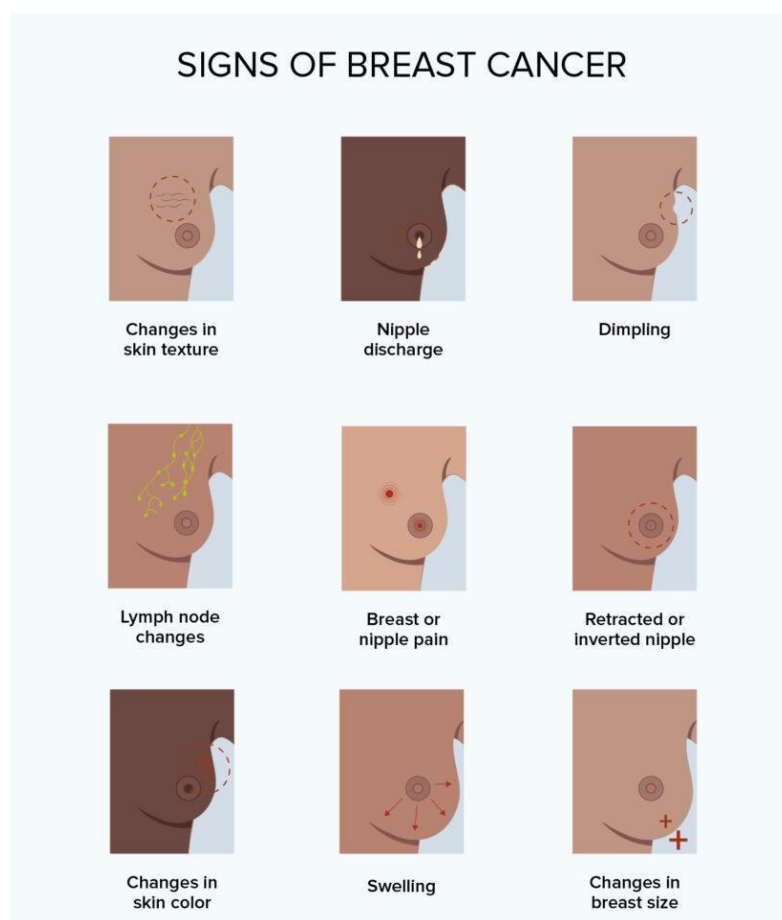
The purpose of this study was to identify the expression of the ER β isoforms, ER β 1 and ER β 2, in tissue sections from ER α -positive breast cancer tumors and to correlate it with available clinico-pathological characteristics of tumors. This study aims to contribute to the investigation of the prognostic significance of ER β 1 and ER β 2 in disease progression and selection of the appropriate treatment.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καρκίνος του Μαστού

1.1.1 Στατιστικά

Ο καρκίνος του μαστού (ΚΤΜ) αποτελεί το συχνότερο είδος καρκίνου που πλήττει τις γυναίκες. Τα στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας για το 2020 αναφέρουν ότι 2,3 εκατομμύρια γυναίκες διαγνώστηκαν με καρκίνο του μαστού και 685 χιλιάδες πέθαναν από αυτόν σε όλον τον κόσμο (WHO, 2021). Στο Ηνωμένο Βασίλειο κάθε χρόνο διαγιγνώσκονται 55,500 γυναίκες και 370 άνδρες με το συγκεκριμένο είδος καρκίνου (Cancer Research UK, 2023). Ιδιαίτερα σημαντικό όμως είναι ότι 7,8 εκατομμύρια γυναίκες κατάφεραν να επιζήσουν της διάγνωσης τους, η οποία είχε γίνει μέσα στα πέντε προηγούμενα χρόνια (WHO, 2021). Η Εικόνα 1 παρουσιάζει κάποιες από τις συχνότερες ενδείξεις καρκίνου του μαστού.



Εικόνα 1. Μερικές από τις συχνότερες ενδείξεις καρκίνου του μαστού, εκτός της εμφάνισης ύποπτης μάζας, αποτελούν οι αλλαγές στην εικόνα του μαστού, κυρίως στην υφή του δέρματος, στο μέγεθος, στο χρώμα. Ο πόνος, το οίδημα και οι εκκρίσεις από τις θηλές αποτελούν επίσης ανησυχητικές ενδείξεις (<https://www.medicalnewstoday.com/articles/322832>).

1.1.2. Παράγοντες Κινδύνου

Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του μαστού επηρεάζεται κατ' εξοχήν από παράγοντες που δεν μπορούν να ελεγχθούν, όπως η μεγαλύτερη ηλικία, το οικογενειακό ιστορικό και η γενετική προδιάθεση (για παράδειγμα μεταλλάξεις των γονιδίων BRCA1 και BRCA2), η ηλικία που άρχισε η έμμηνος ρύση και η εμμηνόπαυση και η πυκνότητα των μαστών. Επίσης, σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζει προηγούμενο ιστορικό καρκίνου ή άλλων παθήσεων του μαστού καθώς και η ακτινοθεραπεία άλλων ασθενειών/καρκίνων στην περιοχή. Επιπλέον, η έκθεση σε εμβρυικό στάδιο σε φάρμακα όπως η διαιθυλοστιλβεστρόλη, ουσία που χορηγούνταν κατά κόρον στα μέσα του προηγούμενου αιώνα σε εγκύους για την αποτροπή αποβολών, μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο ανάπτυξης καρκίνου του μαστού τόσο στις ίδιες τις γυναίκες που το έλαβαν, όσο και στις κόρες τους.

Υπάρχουν όμως και κάποιοι παράγοντες όπως ο τρόπος ζωής, η άσκηση, η σωστή διατροφή και η διατήρηση υγιούς βάρους, η κατανάλωση αλκοόλ και το κάπνισμα που, αν ελεγχθούν, μπορούν να συμβάλλουν στην πρόληψη του καρκίνου του μαστού. Επιπλέον, η λήψη ορμονών κατά την εμμηνόπαυση ή η χρήση αντισυλληπτικών μπορεί να αυξήσει τις πιθανότητες ανάπτυξης καρκίνου του μαστού. Τέλος, το αναπαραγωγικό ιστορικό, όπως η εγκυμοσύνη, ιδιαίτερα πριν από τα τριάντα έτη και ο θηλασμός του βρέφους μπορεί να μειώσουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. (https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/risk_factors.htm, 2022).

1.1.3 Σταδιοποίηση - Σύστημα TNM





Η σταδιοποίηση του καρκίνου μαστού πραγματοποιείται με βάση την εντόπιση και το μέγεθος του όγκου στο αρχικό σημείο με χρήση του συστήματος TNM (Amin et al. 2017, Brierley et al. 2017):

T (Tumor): Σταδιοποίηση με βάση το μέγεθος του αρχικού όγκου.

N (Node): Σταδιοποίηση εξάπλωσης του καρκίνου στους επιχώριους λεμφαδένες,

M (Metastasis): Σταδιοποίηση με βάση την ανίχνευση απομακρυσμένων μεταστάσεων σε άλλα σημεία του σώματος.

Στην Εικόνα 2 φαίνεται ο διαχωρισμός των τριών αυτών σταδίων σε επιμέρους κατηγορίες.

Tumor size	Tumor size < 2 cm	Tumor size 2-5 cm	Tumor size > 5 cm	Tumor extends to skin or chest wall
T	 T1	 T2	 T3	 T4
Lymph Nodes	N0 No lymph node metastasis	N1 Metastasis to ipsilateral, movable, axillary LNs	N2 Metastasis to ipsilateral fixed axillary, or IM LNs	N3 Metastasis to infraclavicular/supraclavicular LN, or to axillary and IM LNs
Metastasis	M0 No distant metastasis	M1 Distant metastasis	LNs= Lymph Nodes; IM= Internal Mammary	
M				

Εικόνα 2. Παρουσίαση του TNM συστήματος σταδιοποίησης του καρκίνου του μαστού.

(<https://epomedicine.com/medical-students/tnm-staging-breast-cancer-simplified/>)

1.1.4 Μοριακοί Τύποι Καρκίνου του Μαστού

Οι μοριακοί τύποι καρκίνου του μαστού χαρακτηρίζονται ιστολογικά με βάση την έκφραση ή όχι υποδοχέων πυρηνικών ορμονών, συγκεκριμένα του υποδοχέα οιστρογόνων άλφα (ERα) και του υποδοχέα προγεστερόνης (PgR) καθώς και την έκφραση της ογκοπρωτεΐνης HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2, ανθρώπινος υποδοχέας του επιδερμικού παράγοντα αύξησης 2).

Οι κυριότεροι μοριακοί τύποι καρκίνου του μαστού είναι:

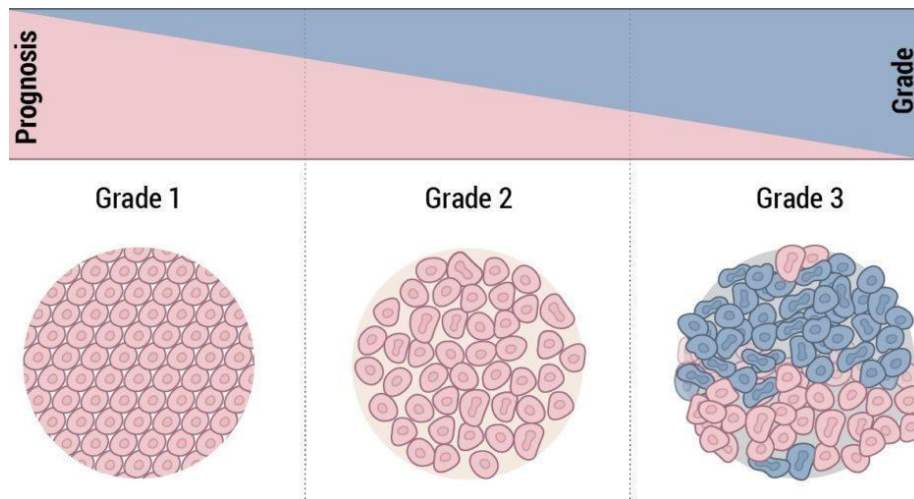
- ERα-θετικοί, γνωστοί και ως αυλικού τύπου A (ERα+, PgR+, HER2-) και B (ERα+, PgR-, HER2+). Αποτελούν περίπου το 70% των περιπτώσεων.
- Υπερεκφράζοντες την ογκοπρωτεΐνη HER-2, οι οποίοι δεν εκφράζουν ορμονικούς υποδοχείς (ERα-, PgR-, HER2+). Αποτελούν περίπου το 10-15% των περιπτώσεων.

➤ Τριπλά αρνητικοί, οι οποίοι δεν εκφράζουν ούτε τους ορμονικούς υποδοχείς (ERα, PgR) ούτε την ογκοπρωτεΐνη HER2 (ERα-, PgR-, HER2-). Έχουν την χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τους υπολοίπους (Łukasiewicz et al. 2021).

1.1.5 Βαθμός Διαφοροποίησης

Τα περιστατικά καρκίνου του μαστού κατατάσσονται σε 3 κατηγορίες με βάση τον βαθμό διαφοροποίησης των καρκινικών κυττάρων (Frank et al. 2013, Vuong et al. 2014) όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 3 :

- Υψηλού βαθμού διαφοροποίησης (Grade 1): Καρκινικά κύτταρα με καλή διαφοροποίηση ή και σχετικά φυσιολογική όψη.
- Μεσαίου βαθμού διαφοροποίησης (Grade 2): Καρκινικά κύτταρα με χαρακτηριστικά ανάμεσα σε χαμηλού και υψηλού βαθμού διαφοροποίησης.
- Χαμηλού βαθμού διαφοροποίησης (Grade 3): Καρκινικά κύτταρα με μη φυσιολογικά χαρακτηριστικά.



Εικόνα 3. Βαθμός διαφοροποίησης κυττάρων καρκίνου του μαστού. Η πρόγνωση δυσχεραίνει όσο χαμηλότερος είναι ο βαθμός διαφοροποίησης. (<https://pathology.jhu.edu/breast/staging-grade/>, τροποποιημένη εικόνα)

1.2 Υποδοχείς Οιστρογόνων

1.2.1 Γενικά

Οι υποδοχείς οιστρογόνων ανήκουν στην οικογένεια των πυρηνικών υποδοχέων και συγκεκριμένα στην κατηγορία των υποδοχέων στεροειδών ορμονών. Είναι μεταγραφικοί παράγοντες που διαμεσολαβούν τη δράση των οιστρογόνων επηρεάζοντας την έκφραση χιλιάδων γονιδίων. Τα οιστρογόνα ελέγχουν κυρίως τρεις γυναικείες βιολογικές διεργασίες: την εφηβική ανάπτυξη, τη ρύθμιση των οιστρικών κύκλων και τη δημιουργία και διατήρηση του μαστικού ιστού. Η έκκρισή τους γίνεται από τις ωθήκες, τους μαστούς, αλλά και τους όρχεις, ενώ σε μικρότερο βαθμό από τα επινεφρίδια και άλλους ιστούς. Επιπλέον, παίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ανάπτυξη, στον έλεγχο του σκελετικού συστήματος, του καρδιαγγειακού συστήματος και του κεντρικού και περιφερικού νευρικού συστήματος. Οι δράσεις των οιστρογόνων διαμεσολαβούνται από δύο ιστοτύπους του υποδοχέα οιστρογόνων, τον ERα και τον ERβ.

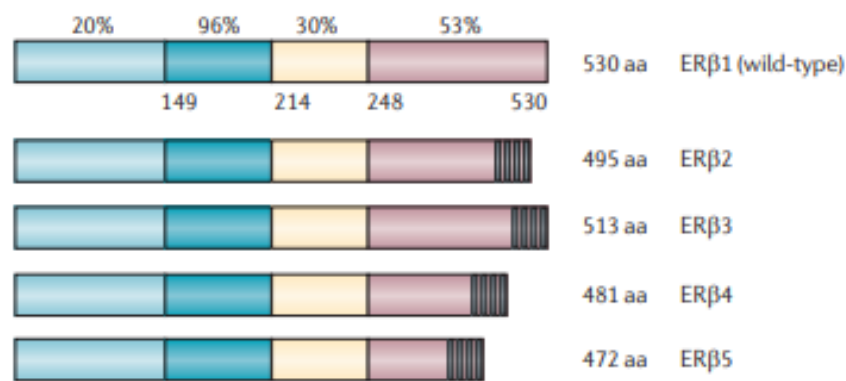
Ο υποδοχέας των οιστρογόνων τύπου α (ERα) κωδικοποιείται από το γονίδιο ESR1 και είναι ο πρώτος υπότυπος του υποδοχέα οιστρογόνων που ανακαλύφθηκε (Green et al. 1986). Εκφράζεται σε πληθώρα ιστών, όπως του αναπαραγωγικού συστήματος, αλλά και στο ήπαρ και στα οστά (Kavousiourou et al. 2017). Στον καρκίνο του μαστού παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο, καθώς είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος προγνωστικός δείκτης ανταπόκρισης στην ενδοκρινική θεραπεία και εκφράζεται στο 70-75% των διηθητικών καρκινωμάτων του μαστού (Colomer et al. 2017).

Ο ERβ αποτελεί τον δεύτερο υπότυπο του υποδοχέα των οιστρογόνων που ανακαλύφθηκε από την ομάδα του Jan-Åke Gustafsson (Kuijper et al. 1996). Κωδικοποιείται από το γονίδιο ESR2 που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 14. Αν και έχει μέτρια συνολική ομολογία με το ERα, παρουσιάζει 60% ομολογία στο τμήμα σύνδεσης της ορμόνης και 96% ομολογία στο τμήμα σύνδεσης με το DNA καθιστώντας τον ERβ ικανό να ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων που αποτελούν στόχους και του ERα (Leung et al. 2012).

Έχουν ταυτοποιηθεί πέντε ισομορφές του ERβ (ERβ1-ERβ5) οι οποίες διαφέρουν στο καρβοξυτελικό τους άκρο. Στην Εικόνα 4 φαίνονται οι πέντε ισομορφές του ERβ με τις διαφορές στο καρβοξυτελικό τους άκρο που επηρεάζουν την ικανότητα σύνδεσης της ορμόνης (Thomas & Gustafsson, 2011). Ο ERβ1 είναι η πλήρους μήκους ισομορφή και συνδέει οιστρογόνα και αντιοιστρογόνα με υψηλή συγγένεια, ενώ οι ισομορφές ERβ2, ERβ3, ERβ4, ERβ5 αποτελούν προϊόντα εναλλακτικού ματίσματος χωρίς ικανότητα σύνδεσης προσδετών (Leung et al. 2006). Οι ισομορφές ERβ1 και ERβ2 εκφράζονται συχνότερα στο καρκίνο του μαστού (Green et al. 2008). Ωστόσο, κάθε ισομορφή συσχετίζεται με διαφορετικά κλινικά

αποτελέσματα και είναι κρίσιμο να μελετηθεί ο ρόλος τους στην πρόγνωση και τη θεραπεία ασθενών με καρκίνο του μαστού.

Οι ισομορφές του ERβ σχηματίζουν τόσο ομοδιμερή όσο και ετεροδιμερή στα οποία συμμετέχει πάντα ο ERβ1 (Leung et al. 2006). Οι ισομορφές ERβ1, ERβ2 και ERβ5 μπορούν να σχηματίζουν ετεροδιμερή με τον ERα καταστέλλοντας τη μεταγραφική δράση του δεύτερου (Zhao et al. 2007, Powell et al 2012). Η συνύπαρξη των δύο υποδοχέων μπορεί να επηρεάσει διάφορες λειτουργίες του κυττάρου, όπως τον ρυθμό πολλαπλασιασμού, τη σύνδεση με οιστρογόνα και συνεπώς, την απόκριση σε ορμονικές θεραπείες που στοχεύουν τον καρκίνο του μαστού (Powell et al. 2012).

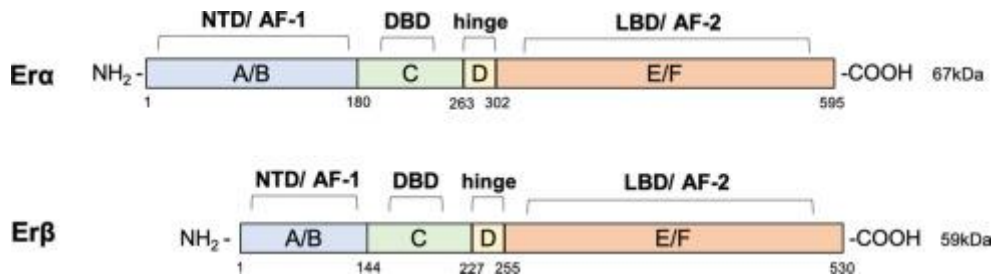


Εικόνα 4. Οι πέντε ισομορφές (ERβ1 - ERβ5) του ERβ (Thomas & Gustafsson, 2011, τροποποιημένη εικόνα).

1.2.2 Δομή και μηχανισμός Δράσης Υποδοχέων Οιστρογόνων

Οι υποδοχείς οιστρογόνων όπως και όλοι οι υποδοχείς στεροειδών ορμονών αποτελούνται από τις παρακάτω πέντε λειτουργικές περιοχές (Εικόνα 5) (Fuentes & Silveyra, 2019):

- A-B: Βρίσκεται στο αμινοτελικό άκρο του υποδοχέα και περιλαμβάνει τη λειτουργία ενεργοποίησης της μεταγραφής 1 (AF-1).
- C: Περιοχή σύνδεσης στο DNA (DNA Binding Domain – DBD).
- D: Ευέλικτη περιοχή μεταξύ των C και E (hinge region).
- E: Περιοχή σύνδεσης της ορμόνης (προσδέτη) (Ligand Binding Domain – LBD) που περιλαμβάνει την εξαρτώμενη από την ορμόνη λειτουργία ενεργοποίησης της μεταγραφής 2 (AF2).
- F: Βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα και παίρνει διαφορετική διαμόρφωση ανάλογα με τη σύνδεση αγωνιστών (οιστρογόνα) ή ανταγωνιστών (αντιοιστρογόνα).



Εικόνα 5. Οι πρωτεϊνικές δομές των ERα και ERβ (Fuentes & Silveyra, 2019).

Απουσία προσδέτη, οι υποδοχείς οιστρογόνων βρίσκονται στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες θερμικού σοκ (heat shock proteins-hsp), σε διαμόρφωση που επιτρέπει τη σύνδεση ορμόνης (Huang et al. 2010). Μετά τη δέσμευση του προσδέτη, οι ERs μετατοπίζονται στον πυρήνα και συνδέονται ως διμερή σε ειδικές αλληλουχίες απόκρισης στα οιστρογόνα (estrogen responsive elements, ERE), που βρίσκονται συνήθως στους υποκινητές γονιδίων-στόχων των οιστρογόνων, τη μεταγραφή των οποίων ενεργοποιούν ή καταστέλλουν μέσω προσέλευσης συν-ενεργοποιητών ή συν-καταστολέων, αντίστοιχα (Thomas & Gustafsson, 2011). Η πρόσδεση αγωνιστών (οιστρογόνα) ή ανταγωνιστών (αντιοιστρογόνα, όπως η ταμοξιφαίνη) στο LBD του ER οδηγεί σε διαφορετική διαμόρφωση της έλικας 12 στο καρβοξυτελικό άκρο του υποδοχέα και διαφορετική δράση ανάλογα με τον προσδέτη (Shiau et al. 1998). Ωστόσο, οι ERs μπορούν να ασκούν τη δράση τους στη μεταγραφική ρύθμιση μέσω διαφορετικών οδών ακόμη και απουσία προσδέτη, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση ενεργοποίησής τους μετά από φωσφορυλίωση μέσω πρωτεϊνικών κινασών (π.χ. διέγερση από τον υπερενεργοποιημένο EGFR ή τον IGF-1 υποδοχέα) (Britton et al. 2006).

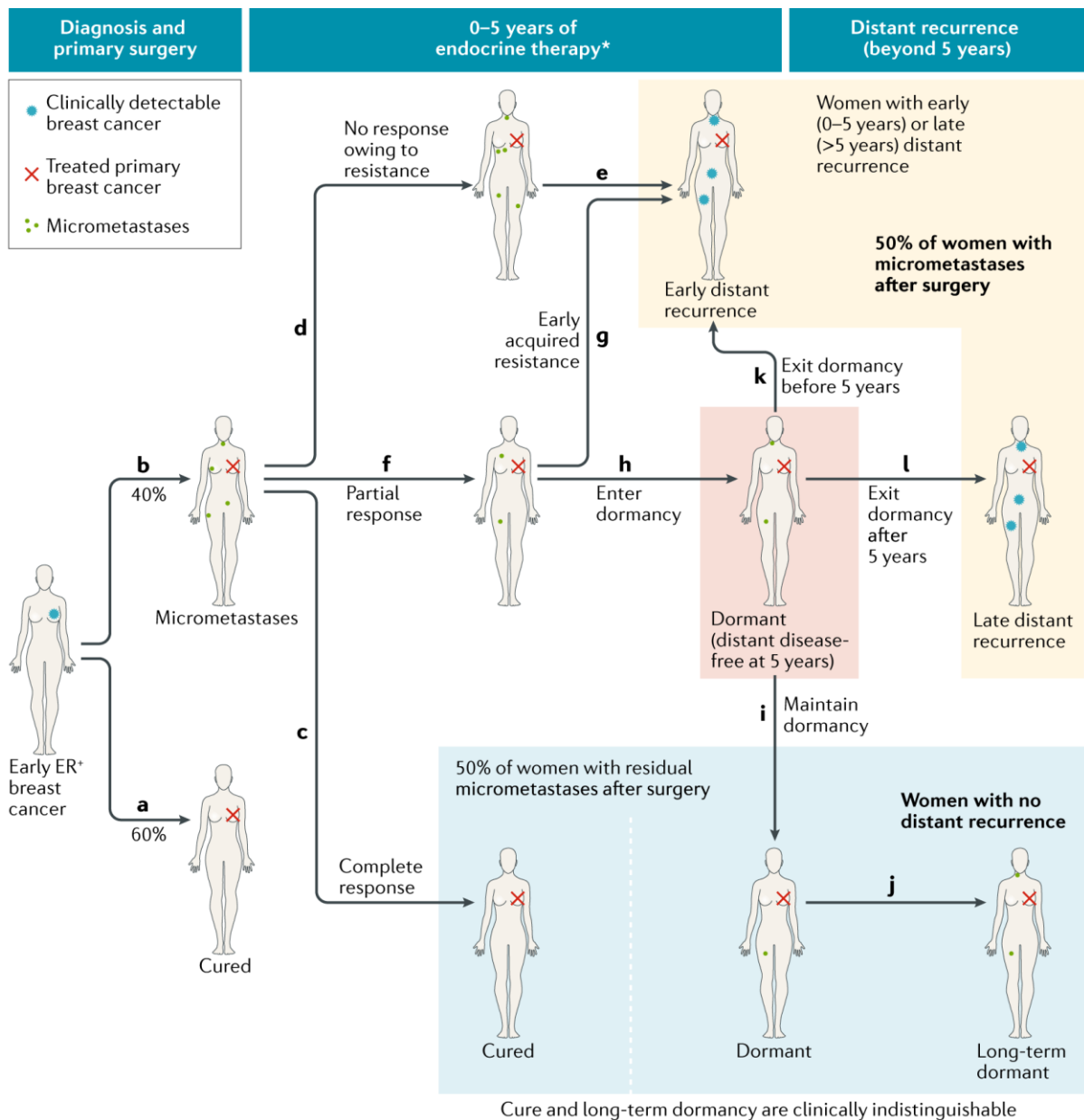
1.3 Θεραπεία καρκίνου του μαστού

Ανάλογα με το προφίλ του κάθε ασθενούς και το μοριακό τύπο του καρκίνου επιλέγεται η κατάλληλη θεραπεία, τοπική (χειρουργική επέμβαση και ακτινοθεραπεία), συστηματική (ορμονική θεραπεία και χημειοθεραπεία) ή και συνδυασμός (Waks et al. 2019). Στον ERα+ και HER2- ΚτΜ συνίσταται συμπληρωματική ενδοκρινική θεραπεία (ΣΕΘ), η οποία περιλαμβάνει: i) εκλεκτικούς ρυθμιστές του ERα (SERMs) όπως το αντιοιστρογόνο ταμοξιφαίνη, ii) εκλεκτικούς αποικοδομητές του ERα (SERD) όπως το IC1182780, και iii) αναστολείς αρωματάσης (του ενζύμου που καταλύει την μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα, όπως η αναστραζόλη), προκειμένου να μειωθούν τα επίπεδα των οιστρογόνων (Joshi and Press, 2018). Η ταμοξιφαίνη για πέντε χρόνια θεωρείται θεραπεία εκλογής για ένα μεγάλο ποσοστό περιστατικών πρώιμου σταδίου ERα+ ΚτΜ (Pan et al. 2017). Η χρήση στοχευμένης

θεραπείας με Herceptin, έναν αναστολέα του ογκογονιδίου HER-2 χρησιμοποιείται στην περίπτωση υπερέκφρασης του ογκογονιδίου HER-2. Σε καρκίνους με αντίσταση στην ορμονική θεραπεία ή που δεν εκφράζουν υποδοχείς οιστρογόνων επιλέγεται και η χημειοθεραπεία. Στην περίπτωση του τριπλά αρνητικού ΚτΜ επιλέγεται συνδυασμός προεγχειρητικής χημειοθεραπείας και μετέπειτα χειρουργικής αφαίρεσης (Cortazar et al. 2014).

Αν και η ορμονική θεραπεία είναι η θεραπεία επιλογής για τους ERα-θετικούς ΚτΜ, υπάρχει ένα ποσοστό 30% το οποίο αναπτύσσει αντίσταση στα αντιοιστρογόνα (Ring et al. 2004). Πιο συγκεκριμένα, όπως αναφέρουν οι Pan et al. (2017) σε μια μετα-ανάλυση των αποτελεσμάτων ασθενών από 88 δοκιμές, ο ERα+ ΚτΜ μπορεί να επανεμφανιστεί έως και 20 χρόνια μετά από μια περίοδο 5 ετών χωρίς νόσο από την ενδοκρινική θεραπεία. Ανάλογα, οι Richman και Dowsett επιβεβαίωσαν ότι ο μακρινός κίνδυνος υποτροπής του ERα+ ΚτΜ παραμένει σταθερός για τουλάχιστον 15 χρόνια μετά τη διακοπή της θεραπείας. Κατά συνέπεια, προβλέπεται ότι μεταξύ 46.000 νέων περιπτώσεων ER+ ΚτΜ που διαγνώστηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο το 2015, 4.000-5.000 (10%) από αυτές θα οδηγήσουν σε μακρινές υποτροπές πέραν των πέντε ετών μετά την αρχική διάγνωση (Εικόνα 6). Επιπλέον, συμπληρωματική ενδοκρινική θεραπεία πέντε ετών με ταμοξιφαίνη μειώνει τη θνησιμότητα κατά 40% και μια δεκαετής θεραπεία με χορήγηση αναστολέων της αρωματάσης αντί της ταμοξιφαίνης στην δεύτερη πενταετία αυξάνει την επιβίωση κατά 43% (Richman & Dowsett, 2019).

Η ανακάλυψη νέων βιοδεικτών πρόβλεψης και νέων μέσων θεραπείας είναι απαραίτητη για την περίπτωση ΚτΜ που εμφανίζει αντίσταση στην ενδοκρινική θεραπεία. Επιπλέον όμως, είναι πολύ σημαντική προκειμένου να αποφευχθούν οι σημαντικές παρενέργειες της ενδοκρινικής θεραπείας (εμβολές, καρκίνος της μήτρας, οστεοπόρωση κ.α.) αν αυτή δεν πρόκειται να ωφελήσει τους ασθενείς (Richman & Dowsett 2019).



Εικόνα 6. Το 60% των ασθενών που θα διαγνωσθούν σε αρχικό στάδιο θα καταφέρουν να αντιμετωπίσουν επιτυχώς τον ΚτΜ μόνο με χειρουργική επέμβαση, ενώ το υπόλοιπο 40% θα έχει μικρομεταστάσεις, για την καταπολέμηση των οποίων θα χορηγηθεί ΣΕΘ για μια περίοδο έως πέντε χρόνια, ενώ ένα μέρος αυτών θα υποτροπιάσει μετά την πάροδο των πέντε ετών (Richman & Dowsett, 2019).

1.4 ERβ και Καρκίνος του Μαστού

Η έκφραση του ERβ φαίνεται να είναι αρκετά συχνή στον καρκίνο του μαστού, με ένα ποσοστό 60% να εμφανίζει θετικότητα (Elebro et al. 2017, Marotti et al. 2010). Η έκφραση του ERβ είναι μειωμένη σε κύτταρα καρκίνου του μαστού σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς ιστούς σε αντίθεση με την έκφραση ERα που αυξάνεται προοδευτικά κατά τη διάρκεια της

καρκινογένεσης του μαστού (Murphy & Leygue, 2012). Ο ακριβής ρόλος του ERβ στον ΚτΜ δεν έχει ακόμα ξεκαθαριστεί. Ανάλογα με την συνύπαρξη ή όχι με τον ERα, η δράση του μπορεί να διαφέρει και να συνδέεται με καλή ή κακή πρόγνωση και με διάφορα άλλα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά του όγκου, όπως το μέγεθος, ο βαθμός διαφοροποίησης, οι διηθημένοι λεμφαδένες κ.α. Η παρουσία του ERβ μπορεί να επηρεάζει τις ενδοκρινικές θεραπείες και να αποτελεί δείκτη απόκρισης σε αυτές (Zhou et al, 2020).

Αντικρουόμενα είναι τα αποτελέσματα για την προγνωστική σημασία των ισομορφών ERβ1 και ERβ2 στον ΚτΜ. Η έκφραση του ERβ1 έχει συσχετιστεί με σημαντικά καλύτερη επιβίωση μετά από θεραπεία με ταμοξιφαίνη σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση, ακόμη και σε ασθενείς με ERα- ή τριπλά αρνητικό ΚτΜ (Honma et al. 2008) Σε άλλη έρευνα η έκφραση του ERβ1 δεν φάνηκε να επηρεάζει την ελευθέρως νόσου επιβίωση, ήταν όμως καίρια για την έκβαση της θεραπείας με ταμοξιφαίνη, αλλά όχι για θεραπεία με αναστολείς αρωματάσης (Speirs et al. 2015). Επίσης, έχει αναφερθεί από τους Liu et al. (2016) ότι η παρουσία του ERβ1 συσχετίζεται και με ευνοϊκή επιβίωση χωρίς νόσο και συνολική επιβίωση σε ασθενείς με θετικούς ERα ΚτΜ. Όσον αφορά τον ERβ2, η πυρηνική εντόπισή του φάνηκε να σχετίζεται με καλύτερη ελευθέρως νόσου επιβίωση και συνολική επιβίωση ενώ η κυτταροπλασματική εντόπισή του σχετίστηκε με σημαντικά χειρότερη συνολική επιβίωση (Shaaban et al. 2008). Άλλη μελέτη έδειξε ότι η έκφραση του ERβ2 σχετίζεται με μικρότερη ελευθέρως νόσου επιβίωση και χειρότερη συνολική επιβίωση σε ασθενείς με ΚτΜ που έλαβαν ταμοξιφαίνη (Baek et al. 2015). Η παρουσία του ERβ1 φαίνεται να σχετίζεται με μικρότερο μέγεθος όγκου και μακρύτερη ελευθέρως νόσου επιβίωση ασθενών με διηθητικό ERα+ ΚτΜ (Mandusic et al. 2012, Zhang et al. 2012), ενώ το αντίθετο φαίνεται για τον ERβ2, ειδικά σε όγκους μικρότερους των 20mm (Zhang et al. 2012).

Προηγούμενη μελέτη της ομάδας Μοριακής Ενδοκρινολογίας έδειξε ότι η παρουσία του ERβ2 σχετίζεται με κακή πρόγνωση και είναι δείκτης υποτροπής του ERα- ΚτΜ μετά από επικουρική χημειοθεραπεία (Chantzi et al. 2013). Ανάλογη μελέτη στον πρώιμο ERα+/HER2- ΚτΜ πρότεινε ότι η χαμηλή έκφραση του ERβ1 είναι δείκτης πρώιμης υποτροπής μετά από ΣΕΘ στον ERα+ ΚτΜ πρώιμων σταδίων, ενώ η υψηλή έκφραση του ERβ2 είναι δείκτης καθυστερημένης υποτροπής (Dhimolea et al. 2015).

Προκειμένου να διερευνηθεί περισσότερο η προγνωστική σημασία των ERβ1 και ERβ2 στην εξέλιξη του πρώιμου ERα+ ΚτΜ, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση των ισομορφών ERβ1 και ERβ2 σε τομές ιστών από 27 ERα-θετικούς όγκους ΚτΜ και η συσχέτισή τους με διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των όγκων.

2. ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Υλικά και Μέθοδοι

2.1.1 Υλικά

2.1.1.1 Γενικά υλικά

Διάλυμα ξυλόλης / Xylene, mix of isomers, CARLO ERBA Reagents srl

Διάλυμα αιθανόλης / Dehyol absolute, Bio-Optica

Υπεροξειδίο του υδρογόνου / Hydrogen peroxide 30%

Μεθανόλη / Methanol a.r., Chem-Lab NV

Ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού οξέος (0,01M, pH 6) / Citrate Buffer

Διάλυμα TBS (pH 7,4) / Tris-buffered saline (TBS)

Απορρυπαντικό Tween 20, Sigma-Aldrich

Αιματοξυλίνη/Hematoxylin, Mayer's (Lillie's Modification), Zytomeb Systems GmbH

Διάλυμα δέσμευσης μη ειδικών θέσεων / Blocking Solution, Zytomeb Systems GmbH

Διαλύτης αντισώματος / Antibody Diluent, Zytomeb Systems GmbH

Σειρά διαλυμάτων χρώσης πλακιδίων / Super Sensitive™ Polymer HRP Kit, Biogenex

Μέσο κάλυψης / DPX Mountant Low Viscosity, Atom Scientific

Καλυπτρίδες / Deckglaser Cover Glasses 22x22

Φούρνος θέρμανσης

Φούρνος Μικροκυμάτων

2.1.1.2 Αντισώματα

Για την ανίχνευση του υποδοχέα ERβ1 χρησιμοποιήθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα mB1C1 σε συγκέντρωση 5 µg/ml. Το αντίσωμα αυτό οποίο αναπτύχθηκε έναντι του μοναδικού καρβοξυτελικού άκρου του ERβ1 στο εργαστήριο Μοριακής Ενδοκρινολογίας (Chantzi et al. 2011).

Για τον υποδοχέα ERβ2 χρησιμοποιήθηκε ο κλώνος 57/3 μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του ανθρώπινου ERβ2 (MCA2279 της εταιρείας BIO-RAD) σε συγκέντρωση 5-10 µg/ml. Το αντίσωμα αυτό αναπτύχθηκε έναντι του μοναδικού καρβοξυτελικού άκρου του ERβ2 (Saunders et al. 2002).

2.1.1.3 Δείγματα ασθενών

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τομές από 27 δείγματα ασθενών με πρωτοπαθές διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μαστού. Αντιπροσωπευτικά μπλοκ παραφίνης του όγκου ήταν διαθέσιμα στο Αρεταίειο Νοσοκομείο (Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ΕΚΠΑ). Όλες οι ασθενείς έδωσαν συγκατάθεση τη στιγμή της χειρουργικής επέμβασης για τη χρήση υλικού ιστού για ερευνητικούς σκοπούς και οι όγκοι τους έχουν εξεταστεί και κατατεθεί στο παθολογοανατομικό εργαστήριο του Αρεταίειου Νοσοκομείου.

2.1.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.2.1 Ανοσοϊστοχημεία

2.1.2.1.1 Ανοσοϊστοχημική χρώση τομών όγκου από μπλοκ παραφίνης

Η ανοσοϊστοχημεία αποτελεί μέθοδο ανίχνευσης πρωτεϊνών σε ιστούς και χρησιμοποιείται ιδιαίτερα στη διάγνωση, στην πρόγνωση και στην επιλογή θεραπείας στον καρκίνο. Βασίζεται στην ειδικότητα του αντισώματος για την εκάστοτε πρωτεΐνη (αντιγόνο), το σύμπλοκο των οποίων συνδέεται με δευτερογενές αντίσωμα και εν τέλει χρωματίζεται, κάνοντας δυνατό τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό του μέσω μικροσκοπίας όπως περιγράφεται παρακάτω.

Τα πλακίδια των τομών των καρκινικών όγκων μαστού θερμαίνονταν σε φούρνο στους 60°C για 30 λεπτά. Ακολουθούσε αποπαραφίνωση με δυο δεκάλεπτες εμβαπτίσεις σε ξυλόλη και ενυδάτωση των ιστών με δυο πεντάλεπτες εμβαπτίσεις σε διαλύματα αλκοολών 100% και μια σε 95%. Κατόπιν, πραγματοποιούνταν απενεργοποίηση της ενδογενούς υπεροξειδάσης με επώαση τριάντα λεπτών στο σκοτάδι, με εμβάπτιση σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου σε μεθανόλη (3%), το οποίο έχει παρασκευασθεί την ίδια στιγμή. Με το πέρας των τριάντα λεπτών, τα δείγματα ξεπλένονταν αρκετές φορές με τρεχούμενο νερό βρύσης και δυο φορές με απεσταγμένο νερό. Αφού τα δείγματα τοποθετούνταν σε διάλυμα κιτρικού, περνούσαν από έξι τετράλεπτους κύκλους θέρμανσης στον φούρνο μικροκυμάτων (800W) με σκοπό την ανάκτηση αντιγόνου. Στο τέλος, αφήνονταν να αποκτήσουν θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα, ξεπλένονταν αρκετές φορές με τρεχούμενο νερό βρύσης και δυο φορές με απεσταγμένο, ενώ ακολουθούσε και μια επώαση πέντε λεπτών με εμβάπτιση σε διάλυμα TBS, πριν από την προσθήκη 80μl Blocking Solution σε κάθε δείγμα για πέντε λεπτά, η οποία έχει σκοπό την απόκλιση σύνδεσης μη ειδικών πρωτεϊνών. Η προσθήκη αυτή γινόταν με καλό σκούπισμα του πλακιδίου γύρω από την τομή για να φύγει η περίσσεια του προηγούμενου διαλύματος, αλλά με γρήγορες κινήσεις, ώστε να μην στεγνώσει η τομή, διαδικασία που επαναλαμβάνονταν σε κάθε επώαση που θα αναφερθεί παρακάτω.

Η επώαση με το Blocking Solution σταματούσε με πεντάλεπτη εμβάπτιση σε διάλυμα TBS. Ταυτόχρονα, παρασκευάζονταν τα εκάστοτε διαλύματα αντισωμάτων.

Το διάλυμα του αντισώματος προστίθετο σε κάθε τομή (περίπου 100μl/πλακίδιο), αφού αυτά τοποθετούνταν σε ειδική κασετίνα με καπάκι, η οποία περιείχε μικρή ποσότητα νερού στη βάση της προκειμένου να διατηρείται η υγρασία και να μην στεγνώσουν οι τομές των ιστών. Τα δείγματα αφήνονταν για ένα βράδυ στους 4°C.

Την επόμενη μέρα, η επεξεργασία των δειγμάτων ξεκινούσε με τρεις πεντάλεπτες εμβαπτίσεις σε διάλυμα TBS, TBS/Tween και ξανά TBS.

Ακολουθούσε επώαση δέκα λεπτών με 80μl Super Enhancer (kit Biogenex) που λειτουργούσε ως δευτερεύον αντίσωμα και μετά ξανά η τριπλή εμβάπτιση σε TBS, TBS-Tween και TBS.

Η διαδικασία επαναλαμβανόταν με την προσθήκη 80μl του πολυμερούς -Poly-HRP (Biogenex) για είκοσι λεπτά, ακολουθούμενο πάλι από την τριπλή εμβάπτιση.

Στη συνέχεια ξεκινούσε η χρώση του αντισώματος με την πεντάλεπτη επώαση με 80μl διαλύματος DAB ανά πλακίδιο, παρασκευασμένης την ίδια στιγμή (80μl DAB σε 1ml ειδικούδιαλύτη του kit της Biogenex). Η χρώση σταματούνταν με διαδοχικές πλύσεις με τρεχούμενο νερό βρύσης και πεντάλεπτη εμβάπτιση σε απεσταγμένο νερό. Ακολουθούσε η χρώση των πυρήνων των κυττάρων με τη χρήση Mayer's hematoxylin για περίπου ένα λεπτό και κατόπιν καλό ξέπλυμα και πεντάλεπτη επώαση με απεσταγμένο νερό.

Το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας ήταν η αφυδάτωση των τομών με διαδοχικές εμβαπτίσεις διαλύματα αλκοολών 70%, 80%, 95%, 100%, 100% και δυο εμβαπτίσεις σε ξυλόλη. Σε κάθε τομή ιστού προστίθετο ειδικό mounting medium και καλυπτρίδα.

2.1.2.1.2 Αξιολόγηση ανοσοϊστοχημικής χρώσης

Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημείας αξιολογήθηκαν από την Παθολογοανατόμο Σωτηρία Στασινοπούλου. Η ανοσοχρώση των ERβ1 και ERβ2 αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του υπολογισμού του Quick score (Rhodes et al. 2000), η οποία είναι μια αθροιστική βαθμολογία (εύρος 0–7) που αποτελείται από βαθμολογίες για την ένταση πυρηνικής ανοσοχρώσης (0-3) και το ποσοστό των βαμμένων καρκινικών κυττάρων (0–4), όπως παρουσιάζεται στον παρακάτω Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Τιμές που αντιστοιχούν στην ένταση και στο ποσοστό της χρώσης για τον υπολογισμό των Quick Scores. Να σημειωθεί ότι για την ένταση της χρώσης χρησιμοποιήθηκε η τιμή που αντιστοιχεί στην πλειονότητα των βαμμένων κυττάρων.

Ένταση Χρώσης	Ποσοστό Χρώσης
0 → Χωρίς χρώση	0 → 0%
1 → Ασθενής χρώση	1 → 1-24%
2 → Μέτρια χρώση	2 → 25–49 %
3 → Ισχυρή χρώση	3 → 50–74 %
	4 → 75–100 %

2.1.2.2 Στατιστική ανάλυση

Για τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων της ανοσοχρώσης των ERβ1 και ERβ2 με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους των όγκων (Πίνακας 1 στο τμήμα ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ) χρησιμοποιήθηκαν ως ποιοτικές μεταβλητές τα παρακάτω:

- το μέγεθος του όγκου: <2 cm έναντι ≥ 2 cm
- η προσβολή ή όχι των περιφερειακών λεμφαδένων
- ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου: I+II έναντι III και I έναντι II+III
- η έκφραση του ERα: I+II έναντι III και I έναντι II+III
- η έκφραση του PgR: I+II έναντι III και I έναντι II+III
- η έκφραση του Ki67: i) <της μέσης τιμής έναντι \geq της μέσης τιμής του ποσοστού των καρκινικών κυττάρων που εμφάνιζαν ειδική πυρηνική χρώση, και ii) I+II έναντι III και I έναντι II+III, όπως συνιστάται από το International Ki67 in Breast Cancer Working Group [IKWG; I για χαμηλή ($\leq 5\%$), II για μέτρια ($>5\%$ και $\leq 30\%$), III για υψηλή έκφραση ($>30\%$)] (Nielsen et al. 2021)

Επιπλέον, ως όρια θετικότητας για την ανοσοχρώση των ERβ1 και ERβ2 χρησιμοποιήθηκαν οι διάμεσες τιμές των Quick Scores.

Για τις παραπάνω συσχετίσεις χρησιμοποιήθηκε το Fisher's exact test.

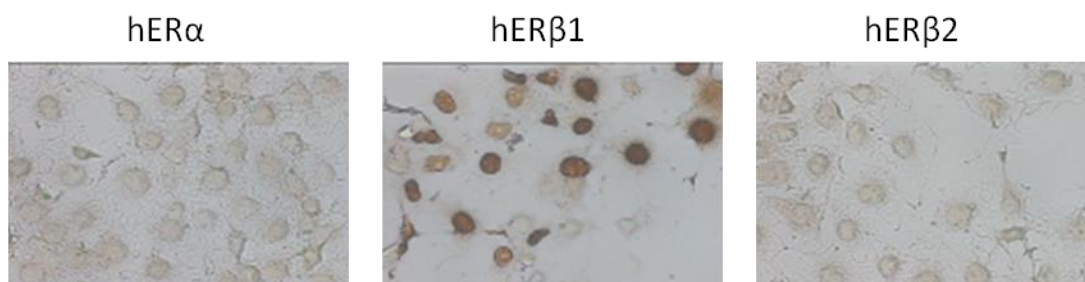
2.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

2.2.1 Ανοσοϊστοχημική χρώση των ERβ1 και ERβ2

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση δύο ισομορφών του υποδοχέα οιστρογόνων βήτα (ERβ), των ERβ1 και ERβ2, σε 27 δείγματα ασθενών με πρώιμο ERα-θετικό καρκίνο του μαστού (ΚτΜ). Η ομάδα των ασθενών αποτελούνταν από 27 γυναίκες που διαγνώστηκαν με πρωτοπαθές διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μαστού και υποβλήθηκαν σε θεραπευτική χειρουργική επέμβαση με λεμφαδενικό καθαρισμό στο Αρεταίειο Νοσοκομείο (Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ΕΚΠΑ).

Κλινικοπαθολογικές παράμετροι όπως το μέγεθος του όγκου, ο ιστολογικός βαθμός και τύπος, η διήθηση των περιφερειακών λεμφαδένων και η έκφραση του ERα, του PgR και του Κί67 ανακτήθηκαν από την ιστοπαθολογική έκθεση και παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Η ομάδα των 27 πορογενών καρκινωμάτων περιελάμβανε 7 καρκινώματα βαθμού διαφοροποίησης III, 14 βαθμού II και 6 βαθμού I. Και οι 27 περιπτώσεις ήταν θετικές για την έκφραση του ERα και 21 από αυτές ήταν θετικές για την έκφραση του PgR.

Η ειδικότητα του αντισώματος mB1C1 επιβεβαιώθηκε με ειδική χρώση κυττάρων που εκφράζουν την ισομορφή ERβ1 αλλά όχι αυτών που εκφράζουν τον ERα ή την ισομορφή ERβ2 όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 1 (Chantzi et al. 2011).

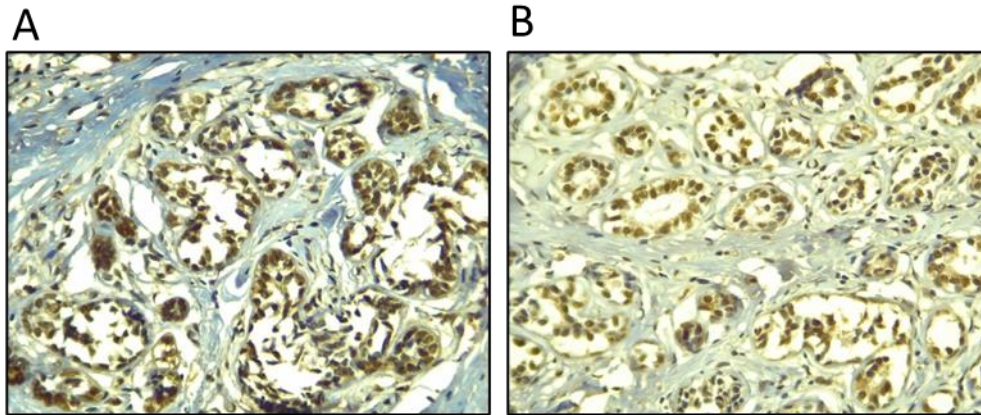


Εικόνα 1. Εκτίμηση της ειδικότητας του αντισώματος mB1C1 με ανοσοκυτταροχημεία. Χρώση κυττάρων COS7 που διαμολύνθηκαν με πλασμίδια που εκφράζουν τον ανθρώπινο (h) ERα, ERβ1 και ERβ2, όπως δηλώνεται, με το αντίσωμα mB1C1 (Chantzi et al. 2011, τροποποιημένη εικόνα).

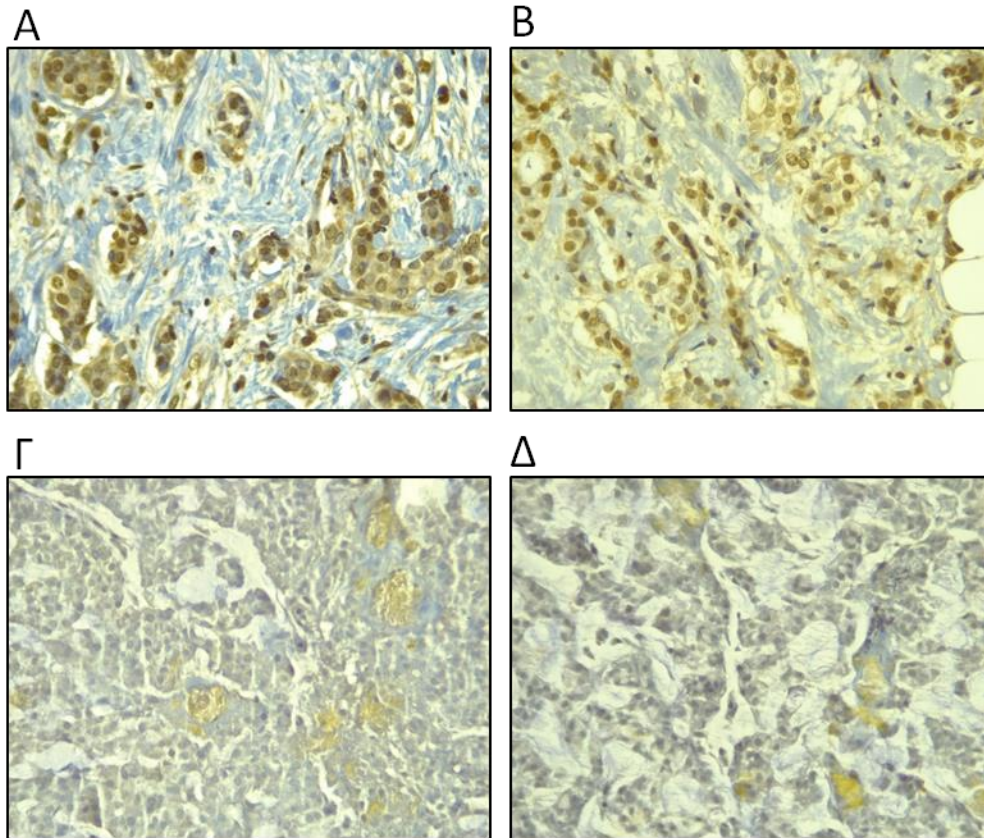
Ανοσοϊστοχημεία με χρήση των αντισωμάτων έναντι του ERβ1 (mB1C1) και του ERβ2 (57/3) σε τομές κύβων παραφίνης φυσιολογικού μαστού έδειξε κυρίως πυρηνική ανοσοχρώση συνοδευόμενη από ήπια κυτταροπλασματική χρώση (Εικόνα 2) σε συμφωνία με την εντόπιση των ERβ1 και ERβ2 κυρίως στον πυρήνα κυττάρων φυσιολογικού μαστού (Chantzi et al. 2013, Dhimolea et al. 2015).

Ανοσοχρώση των 27 ERα-θετικών πορογενών καρκινωμάτων μαστού που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία με τα ίδια αντισώματα αποκάλυψε έντονη πυρηνική εντόπιση και πολύ λιγότερο έντονη κυτταροπλασματική εντόπιση των ERβ1 και ERβ2 (Εικόνα 3). Το ποσοστό

των πυρήνων με θετική χρώση και για τα δύο αντισώματα διέφερε εκτενώς μεταξύ των δειγμάτων όγκου. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα για τον φυσιολογικό μαστό (Εικόνα 2) και με προηγούμενα ευρήματα (Dhimolea et al. 2015). Εκτός από τα επιθηλιακά κύτταρα, πυρηνική εντόπιση και σε πολύ μικρότερο βαθμό κυτταροπλασματική εντόπιση των ERβ1 και ERβ2 βρέθηκε και στα στρωματικά κύτταρα, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες (Middleton et al. 2007, Palmieri et al. 2004, Shaaban et al. 2005, Chantzi et al. 2013, Dhimolea et al. 2015).



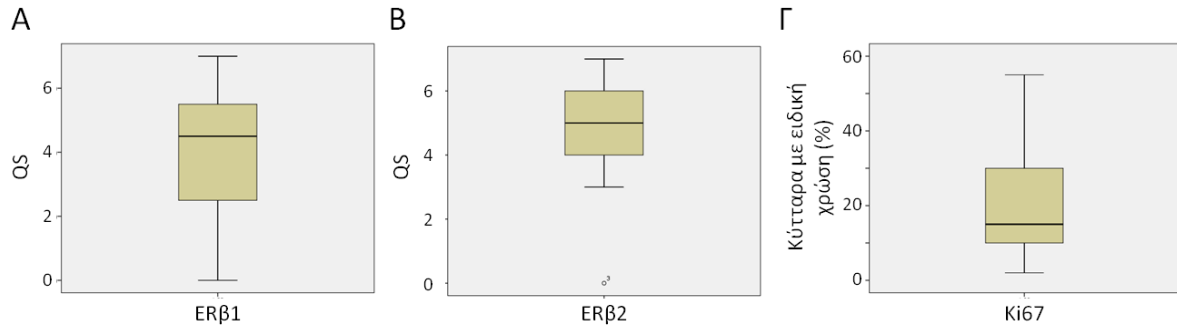
Εικόνα 2. Οι isoμορφές ERβ1 και ERβ2 εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα των κυττάρων του φυσιολογικού μαστού. Ανοσοϊστοχημική χρώση τομών κύβων παραφίνης φυσιολογικού ανθρώπινου μαστού με χρήση των αντισωμάτων mB1C1 (A) ή 57/3 (B). Μεγέθυνση: x400.



Εικόνα 3. Οι ισομορφές ERβ1 και ERβ2 εντοπίζονται κυρίως στον πυρήνα των καρκινικών κυττάρων του μαστού. Ανοσοϊστοχημική χρώση τομών κύβων παραφίνης ERα-θετικών πορογενών καρκινώματα μαστού για τον ERβ1 (A και Γ, αντίσωμα mB1C1) ή τον ERβ2 (B και Δ, αντίσωμα 57/3). Μεγέθυνση: x400.

2.2.2. Συσχέτιση των ERβ1 και ERβ2 με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους

Για την ποσοτικοποίηση της πυρηνικής εντόπισης του ERβ1 και του ERβ2 υπολογίστηκαν τα Quick Scores (QS) όπως περιγράφεται παραπάνω (2.1.2.1.2), Οι τιμές των QS κυμάνθηκαν και για τις δύο ισομορφές από 0 έως 7 και οι μέσες τιμές υπολογίστηκαν στο 4,5 για τον ERβ1 και στο 5 για τον ERβ2 (Εικόνα 4AB και Πίνακας 1).



Εικόνα 4. (Α, Β) Έκφραση των ERβ1 (Α) και ERβ2 (Β) στα 27 δείγματα όγκων. Απόδοση με Box-plot του εύρους κατανομής των QS , των μέσων και των ακραίων τιμών. (Γ) Έκφραση του Ki67 στα 27 δείγματα όγκων. Απόδοση με Box-plot του εύρους κατανομής του % ποσοστού των κυττάρων με θετική πυρηνική ανοσοχρώση του Ki67 και της μέσης τιμής

Πολλαπλές τιμές χρησιμοποιήθηκαν ως όρια για τη διερεύνηση στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων της θετικής εντόπισης των ERβ1 και ERβ2 με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους των όγκων. Ορίζοντας ως δείκτη θετικότητας των ERβ1 και ERβ2 την τιμή QS μεγαλύτερη ή ίση της μέσης τιμής σε κάθε περίπτωση, 12 από τα 24 καρκινώματα (50%) εμφάνισαν θετική πυρηνική εντόπιση του ERβ1, ενώ 18 από τα 25 (72%) θετική πυρηνική εντόπιση του ERβ2. Από τα 12 ERβ1-θετικά καρκινώματα τα 11 ήταν θετικά και για τον έκφραση του ERβ2, ενώ για ένα δεν προσδιορίστηκε η εντόπιση του ERβ2 λόγω τεχνικών προβλημάτων. Από τα 12 ERβ1-αρνητικά καρκινώματα τα 5 έδειξαν θετική και τα 6 αρνητική εντόπιση του ERβ2, ενώ και πάλι για ένα δεν προσδιορίστηκε η εντόπιση του ERβ2 λόγω τεχνικών προβλημάτων. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας, συχνή συνεντόπιση των δύο ισομορφών βρέθηκε και σε προηγούμενες μελέτες της ομάδας μας για τον ERα-αρνητικό και τον ERα-θετικό καρκίνο του μαστού (Chantzi et al. 2013, Dhimolea et al. 2015). Ο Πίνακας 2 παρουσιάζει την ισχυρή συσχέτιση της θετικής πυρηνικής εντόπισης του ERβ1 με τη θετική πυρηνική εντόπιση του ERβ2 ($p = 0.01$). Η ισχυρή αυτή συσχέτιση όμως δεν βρέθηκε στη μελέτη των Dhimolea et al. (2015). Το γεγονός ότι η παρούσα μελέτη αφορά μόνο ERα-θετικά πορογενή καρκινώματα μαστού ενώ η μελέτη των Dhimolea et al. (2015) περιελάμβανε ERα-θετικά πορογενή, λοβιακά, θηλώδη, σωληνώδη και βλενώδη καρκινώματα μαστού θα μπορούσε να εξηγεί φαινομενικές αντιθέσεις. Η συνεντόπιση των ERβ1 και ERβ2 έχει πιθανά κρίσιμο ρόλο για την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού δεδομένου ότι ο ERβ2 έχει αναφερθεί να σχηματίζει ετεροδιμερή με τον ERβ1 και με τον τρόπο αυτό ρυθμίζει τη μεταγραφική του δράση (Leung et al. 2006).

Για τη συσχέτιση με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω ποιοτικές μεταβλητές (Πίνακας 2) και τα όριά τους όπως περιγράφεται και παραπάνω (2.1.2.2):

- το μέγεθος του όγκου: <2 cm έναντι ≥ 2 cm
- η προσβολή ή όχι των περιφερειακών λεμφαδένων
- ο βαθμός διαφοροποίησης του όγκου: i) I+II έναντι II,I και ii) I έναντι II+III
- η έκφραση του ERα: i) I+II έναντι III, και ii) I έναντι II+III
- η έκφραση του PgR: i) I+II έναντι III, και ii) I έναντι II+III
- η έκφραση του δείκτη κυτταρικού πολλαπλασιασμού Ki67 με δύο τρόπους i) <15% έναντι $\geq 15\%$ που είναι η μέση τιμή του ποσοστού κυττάρων με θετική πυρηνική ανοσοχρώση του Ki67 (Εικόνα 4Γ και Πίνακας 1), και ii) I+II έναντι III και I έναντι II+III, όπως συνιστάται από το International Ki67 in Breast Cancer Working Group [IKWG; I για χαμηλή ($\leq 5\%$), II για μέτρια (>5% και $\leq 30\%$), III για υψηλή έκφραση (>30%)] (Nielsen et al. 2021) .

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε μια τάση για πιθανή συσχέτιση μεταξύ πυρηνικής εντόπισης του ERβ1 και του βαθμού διαφοροποίησης (I έναντι II+III, $p=0,09$). Ο Πίνακας 2 δεν αναδεικνύει κάποια άλλη ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της πυρηνικής εντόπισης των ERβ1 και ERβ2 με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των Dhimolea et al. (2015) στη μελέτη μας δε βρέθηκε συσχέτιση της έκφρασης του ERβ1 με το μέγεθος του όγκου. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω αυτή η διαφορά θα μπορούσε να οφείλεται στο ότι τα αποτελέσματα των Dhimolea et al. (2015) προέρχονται από ομάδα δειγμάτων που περιελάμβανε ERα-θετικά πορογενή, λοβιακά, θηλώδη, σωληνώδη και βλενώδη καρκινώματα μαστού ενώ η παρούσα μελέτη αφορά μόνο ERα-θετικά πορογενή καρκινώματα. Επιπλέον, ο αριθμός των δειγμάτων που παρουσιάζεται εδώ είναι μικρότερος από αυτόν της προηγούμενης μελέτης μας και ίσως δεν είναι αρκετός για να αναδείξει κάποιες σημαντικές συσχετίσεις. Είναι όμως αξιοσημείωτο ότι το 75% των ERβ1-θετικών δειγμάτων αντιστοιχούσε σε μέγεθος όγκου μικρότερο των 2 cm, σε συμφωνία με πολύ πρόσφατα αποτελέσματα του εργαστηρίου που δείχνουν τον προαποπτωτικό ρόλο του ERβ1 (Meligona et al. 2023).

Με βάση τις παραπάνω, περαιτέρω μελέτες με μεγαλύτερο αριθμό δειγμάτων απαιτείται για να διερευνηθεί η συσχέτιση της έκφρασης ERβ1 και ERβ2 και να διαλευκανθεί η ύπαρξη άλλων συσχετίσεων μεταξύ της έκφρασης των ισομορφών και άλλων κλινικοπαθολογικών χαρακτηριστικών.

Πίνακας 1. Quick Scores (QS) της έκφρασης των ERβ1 και ERβ2 και κλινικοπαθολογικές παράμετροι για την ομάδα των 27 ασθενών με πρωτοπαθές διηθητικό πορογενές καρκίνωμα μαστού.

ERβ1 (QS)	ERβ2 (QS)	ΜΕΓΕΘΟΣ	ΒΑΘΜΟΣ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ	ΔΙΗΘΗΣΗ ΛΕΜΦΑΔΕΝΩΝ	ER	PGR	Ki-67 (%)	Ki67 (IKWG)
6	6	≥2cm	(II)	(-)	(III)	(II)	10	II
5	5	≥2cm	(II)	(+)	(III)	-	10	II
4	0	<2cm	(I)	(-)	(III)	-	40	III
5	nd	≥2cm	(II)	(+)	(III)	(II)	30	II
4	4	≥2cm	(I)	(-)	(II)	-	5	I
4	4	≥2cm	(III)	(+)	(III)	(II)	20	II
6	5	<2cm	(II)	(-)	(III)	(III)	10	II
3	4	≥2cm	(II)	(-)	(I)	(II)	35	III
0	5	≥2cm	(III)	(+)	(II)	(I)	55	III
nd	5	<2cm	(I)	(-)	(I)	(II)	2	I
0	3	<2cm	(II)	(-)	(III)	(III)	5	I
0	4	<2cm	(III)	(-)	(III)	(I)	25	II
4	6	<2cm	(I)	(-)	(III)	(II)	5	I
0	nd	≥2cm	(II)	(-)	(II)	(III)	10	II
6	5	<2cm	(III)	(-)	(III)	-	20	II
6	7	<2cm	(II)	(+)	(III)	(I)	30	II
nd	3	≥2cm	(I)	(-)	(II)	(II)	2	I
2	5	<2cm	(II)	(-)	(III)	(III)	35	III
7	7	<2cm	(II)	(-)	(III)	(I)	45	III
0	6	<2cm	(II)	(-)	(III)	-	15	II
7	7	<2cm	(II)	(-)	(III)	(III)	10	II
4	7	<2cm	(I)	(-)	(III)	(I)	15	II
nd	6	≥2cm	(II)	(+)	(III)	(II)	15	II
5	5	<2cm	(III)	(-)	(II)	(III)	40	III
5	5	<2cm	(III)	(-)	(II)	-	5	I
5	5	<2cm	(III)	(-)	(I)	(I)	15	II
5	6	<2cm	(II)	(-)	(III)	(III)	10	II

nd, non-defined

I, II, III: χαμηλή, μέτρια και υψηλή έκφραση

Πίνακας 2. Συσχέτιση της πυρηνικής εντόπισης των ERβ1 και ERβ2 με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους. Για την συσχέτιση των εντόπισης των δύο ισομορφών μεταξύ τους, αλλά και της κάθε ισομορφής με τις κλινικοπαθολογικές παράμετρους εξαιρούνται οι περιπτώσεις που δεν υπάρχει μέτρηση για την αντίστοιχη ισομορφή. Η τιμή του p λήφθηκε χρησιμοποιώντας το Fisher's exact test (two-tailed test).

	ERβ1 (24)			ERβ2 (25)		
	(-)	(+)	p	(-)	(+)	p
Ασθενείς	12 (50%)	12 (50%)		7 (28%)	18 (72%)	
Μέγεθος						
≥2cm	5 (20,83%)	3 (12,5%)	0,67	4 (16%)	4 (16%)	0,16
<2cm	7 (29,16%)	9 (37,5%)		3 (12%)	14 (56%)	
Βαθμός Διαφοροποίησης						
I + II	9 (37,5%)	8 (33,33%)	1,00	5 (20%)	14 (56%)	1,00
III	3 (12,5%)	4 (16,67%)		2 (8%)	4 (16%)	
Βαθμός Διαφοροποίησης						
I	4 (16,66%)	0	0,09	3 (12%)	3 (12%)	0,30
II + III	8 (33,33%)	12 (50%)		4 (16%)	15 (60%)	
Διήθηση Λεμφαδένων						
+	2 (8,33%)	3 (12,5%)	1,00	1 (4%)	4 (16%)	1,00
-	10 (41,67%)	9 (37,5%)		6 (24%)	14 (56%)	
Era						
I+II	4 (16,67%)	3 (12,5%)	1,00	3 (12%)	5 (20%)	0,64
III	8 (33,33%)	9 (37,5%)		4 (16%)	13 (52%)	
Era						
I	1 (4,17%)	1 (4,17%)	1,00	1 (4%)	2 (8%)	1,00
II + III	11 (45,83%)	11 (45,83%)		6 (24%)	16 (64%)	
PGR						
I+II	6 (25%)	5 (20,83%)	1,00	4 (16%)	9 (36%)	1,00
III	3 (12,5%)	4 (16,67%)		1 (4%)	5 (20%)	
PGR						
I	3 (12,5%)	3 (12,5%)	1,00	1 (4%)	5 (20%)	1,00
II+III	6 (25%)	6 (25%)		4 (16%)	9 (36%)	
Ki67 (%)						
≥15% (median)	8 (33,33%)	6 (25%)	0,68	4 (16%)	10 (40%)	1,00
<15% (median)	4 (16,66%)	6 (25%)		3 (12%)	8 (32%)	
Ki67 (IKWG)						
I+II	8 (33,33%)	10 (41,67%)	0,64	3 (12%)	14 (56%)	1,00
III	4 (16,67%)	2 (8,33%)		2 (8%)	4 (16%)	
Ki67 (IKWG)						
I	3 (12,5%)	1 (4,17%)	0,59	3 (12%)	3 (12%)	0,30
II + III	9 (37,5%)	11 (45,83%)		4 (16%)	15 (60%)	
ERβ2						
+	5 (22,72%)	11 (50%)	0,01			
-	6 (27,27%)	0				

3. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η ταυτοποίηση της έκφρασης του ERβ1 και ERβ2, ισομορφές του ERβ, σε τομές ιστών από ERα-θετικούς όγκους καρκίνου του μαστού και η συσχέτισή τους με διαθέσιμα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των καρκινικών όγκων των ασθενών. Δείξαμε ότι πρώτον, υπάρχει ισχυρή συσχέτιση της έκφρασης του ERβ1 με την έκφραση του ERβ2 και δεύτερον, υπάρχει κάποια τάση συσχέτισης μεταξύ έκφρασης του ERβ1 με τον υψηλότερο βαθμό διαφοροποίησης. Αν και δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των ισομορφών και του μεγέθους του όγκου, το 75% των ERβ1-θετικών δειγμάτων αντιστοιχούσε σε μέγεθος όγκου μικρότερο των 2 cm.

Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες προκειμένου να διερευνηθεί σε βάθος η συσχέτιση της έκφρασης των ισομορφών ERβ1 και ERβ2 με τις κλινικοπαθολογικές παραμέτρους των ERα-θετικών όγκων, αλλά και με την εξέλιξη της νόσου προκειμένου να αναδειχθεί πιθανή προγνωστική σημασία τους στην επιλογή κατάλληλης θεραπείας.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Amin, M. B., Greene, F. L., Edge, S. B., Compton, C. C., Gershenwald, J. E., Brookland, R. K., Meyer, L., Gress, D. M., Byrd, D. R., & Winchester, D. P. (2017). The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *67*(2), 93–99. <https://doi.org/10.3322/caac.21388>
- Baek, J.-M., Chae, B.-J., Song, B.-J., & Jung, S.-S. (2015). The potential role of estrogen receptor β in breast cancer. *International Journal of Surgery*, *14*, 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2014.10.007>
- Brierley, J., Gospodarowicz, M. K., & Wittekind, C. (2017). *TNM classification of malignant tumours*. John Wiley & Sons, Inc.
- Britton, D. J., Hutcheson, I. R., Knowlden, J. M., Barrow, D., Giles, M., McClelland, R. A., Gee, J. M. W., & Nicholson, R. I. (2006). Bidirectional cross talk between ER α and EGFR signalling pathways regulates tamoxifen-resistant growth. *Breast Cancer Research and Treatment*, *96*(2), 131–146. <https://doi.org/10.1007/s10549-005-9070-2>
- C. Shawn Green, Peter, M., Speirs, V., & Shaaban, A. M. (2008). The potential role of ER β isoforms in the clinical management of breast cancer. *Histopathology*, *53*(4), 374–380. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2008.02968.x>
- Chantzi, N. I., Meligova, A. K., Dhimolea, E., Petrou, C. C., Mitsiou, D. J., Magafa, V., Pechtelidou, A., Florentin, I., Kitraki, E., Cordopatis, P., Tiniakos, D. G., & Alexis, M. N. (2011). Insights into ectopic estrogen receptor expression, nucleocytoplasmic distribution and interaction with chromatin obtained with new antibodies to estrogen receptors α and β . *Steroids*, *76*(10-11), 974–985. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.05.010>
- Chantzi, N. I., Tiniakos, D. G., Palaiologou, M., Goutas, N., Filippidis, T., Vassilaros, S. D., Dhimolea, E., Mitsiou, D. J., & Alexis, M. N. (2013). Estrogen receptor beta 2 is associated with poor prognosis in estrogen receptor alpha-negative breast carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *139*(9), 1489–1498. <https://doi.org/10.1007/s00432-013-1467-4>
- Colomer, R., Aranda-López, I., Albanell, J., García-Caballero, T., Ciruelos, E., López-García, M. Á., Cortés, J., Rojo, F., Martín, M., & Palacios-Calvo, J. (2017). Biomarkers in breast cancer: A consensus statement by the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology. *Clinical and Translational Oncology*, *20*(7), 815–826. <https://doi.org/10.1007/s12094-017-1800-5>
- Cortazar, P., Zhang, L., Untch, M., Mehta, K., Costantino, J. P., Wolmark, N., Bonnefoi, H., Cameron, D., Gianni, L., Valagussa, P., Swain, S. M., Prowell, T., Loibl, S., Wickerham, D. L., Bogaerts, J., Baselga, J., Perou, C., Blumenthal, G., Blohmer, J., & Mamounas, E. P.

- (2014). Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *The Lancet*, 384(9938), 164–172. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)62422-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)62422-8)
- Dhimolea, E., Tiniakos, D. G., Chantzi, N. I., Goutas, N., Vassilaros, S. D., Mitsiou, D. J., & Alexis, M. N. (2015). Estrogen receptors β 1 and β 2 are associated with distinct responses of estrogen receptor α -positive breast carcinoma to adjuvant endocrine therapy. *Cancer Letters*, 358(1), 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.022>
- Elebro, K., Borgquist, S., Rosendahl, A. H., Markkula, A., Simonsson, M., Jirström, K., Rose, C., Ingvar, C., & Jernström, H. (2016). High Estrogen Receptor β Expression Is Prognostic among Adjuvant Chemotherapy–Treated Patients—Results from a Population-Based Breast Cancer Cohort. *Clinical Cancer Research*, 23(3), 766–777. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-16-1095>
- Frank, G. A., Danilova, N. V., Andreeva, I. I., & Nefedova, N. A. (2013). [WHO classification of tumors of the breast, 2012]. *Arkhiv Patologii*, 75(2), 53–63. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24006766/>
- Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 116, 135–170. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.-M., Argos, P., & Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, 320(6058), 134–139. <https://doi.org/10.1038/320134a0>
- Hall, J. M., McDonnell, D. P., & Korach, K. S. (2002). Allosteric Regulation of Estrogen Receptor Structure, Function, and Coactivator Recruitment by Different Estrogen Response Elements. *Molecular Endocrinology*, 16(3), 469–486. <https://doi.org/10.1210/mend.16.3.0814>
- Honma, N., Horii, R., Iwase, T., Saji, S., Younes, M., Takubo, K., Matsuura, M., Ito, Y., Akiyama, F., & Sakamoto, G. (2008). Clinical Importance of Estrogen Receptor- β Evaluation in Breast Cancer Patients Treated With Adjuvant Tamoxifen Therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 26(22), 3727–3734. <https://doi.org/10.1200/jco.2007.14.2968>
- Huang, P., Chandra, V., & Rastinejad, F. (2010). Structural Overview of the Nuclear Receptor Superfamily: Insights into Physiology and Therapeutics. *Annual Review of Physiology*, 72(1), 247–272. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135917>
- Joshi, H., & Press, M. F. (2018). Molecular Oncology of Breast Cancer. *The Breast*, 282-307.e5. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-35955-9.00022-2>
- Kavousipour, S., Solomon, C., Barazeh, M., Razban, V., Alizadeh, J., & Mokarram, P. (2017). Interconnection of Estrogen/Testosterone Metabolism and Mevalonate Pathway in Breast and Prostate Cancers. *Current Molecular Pharmacology*, 10(2), 86–114. <https://doi.org/10.2174/1874467209666160112125631>

- Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., & Gustafsson, J. A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*(12), 5925–5930. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5925>
- Leung, Y.-K., Mak, P., Hassan, S., & Ho, S.-M. (2006). Estrogen receptor (ER)-beta isoforms: A key to understanding ER-beta signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(35), 13162–13167. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605676103>
- Leung, Y.-K., Lee, M.-T., Lam, H.-M., Tarapore, P., & Ho, S.-M. (2012). Estrogen receptor-beta and breast cancer: Translating biology into clinical practice. *Steroids*, *77*(7), 727–737. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2012.03.008>
- Liu, J., Guo, H., Mao, K., Zhang, K., Deng, H., & Liu, Q. (2016). Impact of estrogen receptor- β expression on breast cancer prognosis: a meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment*, *156*(1), 149–162. <https://doi.org/10.1007/s10549-016-3721-3>
- Łukasiewicz, S., Czezelewski, M., Forma, A., Baj, J., Sitarz, R., & Stanisławek, A. (2021). Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review. *Cancers*, *13*(17), 4287. <https://doi.org/10.3390/cancers13174287>
- Mandusic Vesna, Dimitrijević Bogomir, Nikolic-Vukosavljevic Dragica, Neskovic-Konstantinovic, Z., Kanjer Ksenija, & Hamann, U. (2012). Different associations of estrogen receptor β isoforms, ER β 1 and ER β 2, expression levels with tumor size and survival in early- and late-onset breast cancer. *Cancer Letters*, *321*(1), 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.02.022>
- Marotti, J. D., Collins, L. C., Hu, R., & Tamimi, R. M. (2009). Estrogen receptor- β expression in invasive breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. *Modern Pathology*, *23*(2), 197–204. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2009.158>
- Meligova, A. K., Dimitra Siakouli, Sotiria Stasinopoulou, Xenopoulou, D. S., Zoumpouli, M., Vassiliki Ganou, Eleni-Fani Gkotsi, Aristotelis Chatziioannou, Papadodima, O., Eleftherios Pilalis, Alexis, M. N., & Mitsiou, D. J. (2023). ER β 1 Sensitizes and ER β 2 Desensitizes ER α -Positive Breast Cancer Cells to the Inhibitory Effects of Tamoxifen, Fulvestrant and Their Combination with All-Trans Retinoic Acid. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(4), 3747–3747. <https://doi.org/10.3390/ijms24043747>
- Middleton, L. P., Perkins, G. H., Tucker, S. L., Sahin, A. A., & S. Eva Singletary. (2007). Expression of ER α and ER β in lobular carcinoma in situ. *Histopathology*, *50*(7), 875–880. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2007.02689.x>
- Murphy, L. C., & Leygue E. (2012). The Role of Estrogen Receptor- β in Breast Cancer. *Seminars in Reproductive Medicine*, *30*(01), 05-13. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1299592>
- Nielsen, T. O., Leung, S. C. Y., Rimm, D. L., Dodson, A., Acs, B., Badve, S., Denkert, C., Ellis, M. J., Fineberg, S., Flowers, M., Kreipe, H. H., Laenkholm, A.-V., Pan, H., Penault-Llorca, F. M.,

- Polley, M.-Y., Salgado, R., Smith, I. E., Sugie, T., Bartlett, J. M. S., & McShane, L. M. (2020). Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Updated Recommendations From the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 113(7). <https://doi.org/10.1093/jnci/djaa201>
- Palmieri, C., Saji, S., Sakaguchi, H., Cheng, G., Sunter, A., O'Hare, M., Warner, M., Gustafsson, J., Coombes, R., & Lam, E. (2004). The expression of oestrogen receptor (ER)-beta and its variants, but not ERalpha, in adult human mammary fibroblasts. *Journal of Molecular Endocrinology*, 33(1), 35–50. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0330035>
- Pan, H., Gray, R., Braybrooke, J., Davies, C., Taylor, C., McGale, P., Peto, R., Pritchard, K. I., Bergh, J., Dowsett, M., & Hayes, D. F. (2017). 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years. *New England Journal of Medicine*, 377(19), 1836–1846. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1701830>
- Powell, E., Shanle, E., Brinkman, A., Li, J., Keles, S., Wisinski, K. B., Huang, W., & Xu, W. (2012). Identification of Estrogen Receptor Dimer Selective Ligands Reveals Growth-Inhibitory Effects on Cells That Co-Express ER α and ER β . *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030993>
- Rhodes, A. (2000). Frequency of oestrogen and progesterone receptor positivity by immunohistochemical analysis in 7016 breast carcinomas: correlation with patient age, assay sensitivity, threshold value, and mammographic screening. *Journal of Clinical Pathology*, 53(9), 688–696. <https://doi.org/10.1136/jcp.53.9.688>
- Richman, J., & Dowsett, M. (2019). Beyond 5 years: enduring risk of recurrence in oestrogen receptor-positive breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(5), 296–311. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0145-5>
- Ring, A., & Dowsett, M. (2004). Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocrine-Related Cancer*, 11(4), 643–658. <https://doi.org/10.1677/erc.1.00776>
- Saunders, K., Millar, M., Macpherson, S., D. Stewart Irvine, Groome, N. P., Evans, L. W., Richard Bowdler Sharpe, & Scobie, G. A. (2002). ER β 1 and the ER β 2 Splice Variant (ER β cx/ β 2) Are Expressed in Distinct Cell Populations in the Adult Human Testis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(6), 2706–2715. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.6.8619>
- Shaaban, A. M., Green, A. R., Karthik S., Alizadeh, Y., A Hughes, T., Harkins, L., Ellis, I. O., Robertson, J., E.C. Paish, Saunders, K., Groome, N. P., & Speirs, V. (2008). Nuclear and Cytoplasmic Expression of ER β 1, ER β 2, and ER β 5 Identifies Distinct Prognostic Outcome for Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research*, 14(16), 5228–5235. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-4528>
- Shaaban, A. M., Jarvis, C., Moore, F., West, C., Dodson, A., & Foster, C. S. (2005). Prognostic Significance of Estrogen Receptor Beta in Epithelial Hyperplasia of Usual Type With Known

- Outcome. *American Journal of Surgical Pathology*, 29(12), 1593–1599.
<https://doi.org/10.1097/01.pas.0000184807.38037.75>
- Shaw, J. A., Udokang, K., Mosquera, J.-M., Chauhan, H., Jones, J. L., & Walker, R. A. (2002). Oestrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas. *The Journal of Pathology*, 198(4), 450–457. <https://doi.org/10.1002/path.1230>
- Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., & Greene, G. L. (1998). The Structural Basis of Estrogen Receptor/Coactivator Recognition and the Antagonism of This Interaction by Tamoxifen. *Cell*, 95(7), 927–937.
[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81717-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81717-1)
- Speirs, V., Viale, G., Mousa, K., Palmieri, C., Reed, S., Nicholas, H., Maggie C.U. Cheang, Jacek Jassem, Per Eystein Lønning, E. Kalaitzaki, van, Birgitte Bruun Rasmussen, Verhoeven, D., Shaaban, A. M., Bartlett, J. F., Bliss, J. M., R. Charles Coombes, A. Brociek, Pliszka, A., & Andersen, J. (2015). Prognostic and predictive value of ER β 1 and ER β 2 in the Intergroup Exemestane Study (IES)—first results from PathIES. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(9), 1890–1897.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdv242>
- Thomas, C., & Gustafsson, J.-Å. (2011). The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 11(8), 597–608. <https://doi.org/10.1038/nrc3093>
- Vuong, D., Simpson, P. T., Green, B., Cummings, M. C., & Lakhani, S. R. (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Archiv*, 465(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1007/s00428-014-1593-7>
- Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment. *JAMA*, 321(3), 288–300.
<https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
- Zhang, H., Zhang, Z., Xuan, L., Zheng, S., Guo, L., Zhan, Q., Qu, X., Zhang, B., Wang, Y., Wang, X., & Song, Y. (2012). Evaluation of ER- α , ER- β 1 and ER- β 2 expression and correlation with clinicopathologic factors in invasive luminal subtype breast cancers. *Clinical and Translational Oncology*, 14(3), 225–231. <https://doi.org/10.1007/s12094-012-0788-0>
- Zhao, C., Matthews, J., Tujague, M., Wan, J., Ström, A., Toresson, G., Lam, E. W-F., Cheng, G., Gustafsson, J.-Å., & Dahlman-Wright, K. (2007). Estrogen Receptor β 2 Negatively Regulates the Transactivation of Estrogen Receptor α in Human Breast Cancer Cells. *Cancer Research*, 67(8), 3955–3962. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-3505>
- Zhou, Y., & Liu, X. (2020). The role of estrogen receptor beta in breast cancer. *Biomarker Research*, 8. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00223-2>